

• 综述 •

植物源外泌体样纳米颗粒及其应用研究进展

潘林思¹, 王文彩², 姚孟宇³, 王晓燕⁴, 张宪智^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院 园艺园林学院, 广东 广州 510225; 2. 广州中医药大学 科技创新中心, 广东 广州 510405;

3. 南方医科大学 附属广东省人民医院(广东医学科学院) 骨肿瘤科, 广东 广州 510000;

4. 广东医科大学 附属廉江市人民医院 博士工作站, 广东 湛江 524400)

[摘要] 植物源外泌体样纳米颗粒(plant-derived exosome-like nanoparticles, PELNs)是从植物组织中分离得到的一类直径为30~300 nm的膜性小泡,其内含有蛋白质、脂质和核酸等成分,在植物自身物质代谢、免疫防御等方面具有重要作用,并且还能够跨界调控真菌、动物细胞的生理活动,具有极大的应用价值。近年来,PELNs的研究急剧增多,越发凸显了3个方面问题:①PELNs的植物材料来源混杂;②缺乏统一的PELNs分离与表征技术体系;③PELNs的生物跨界调控分子机制亟待阐明。该文聚焦于上述问题,首先概述了PELNs的生物发生和组成成分,并讨论了PELNs的分离技术、表征方法,同时对PELNs在生物医学上的应用以及未来的研究方向进行了分析,以期推动PELNs研究规范的建立,为深入解析PELNs的跨界调控作用机制提供理论参考。

[关键词] 外泌体; 植物源外泌体样纳米颗粒; 分离与表征; 跨界调控; 医学应用

Research progress on plant-derived exosome-like nanoparticles and their applications

PAN Lin-si¹, WANG Wen-cai², YAO Meng-yu³, WANG Xiao-yan⁴, ZHANG Xian-zhi^{1*}

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

3. Department of Orthopedics, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510000, China;

4. Doctor Workstation, Lianjiang People's Hospital Affiliated to Guangdong Medical University, Zhanjiang 524400, China)

[Abstract] Plant-derived exosome-like nanoparticles (PELNs) are a class of membranous vesicles with diameters approximately ranging from 30 to 300 nm, isolated from plant tissues. They contain components such as proteins, lipids, and nucleic acids. PELNs play an important role in the metabolism of plant substances and immune defense, and can also cross-regulate the physiological activities of fungi and animal cells, showing significant potential applications. In recent years, research on PELNs has significantly increased, highlighting three main issues: ① the mixed sources of plant materials for PELNs; ② the lack of a unified system for isolating and characterizing PELNs; ③ the urgent need to elucidate the molecular mechanisms underlying the cross-regulation of biological functions by PELNs. This article focused on these concerns. It began by summarizing the biological origin and composition of PELNs, discussing the techniques for isolating and characterizing PELNs, and analyzing their biomedical applications and potential future research directions, aiming to promote the establishment of standardized research protocols for PELNs and provide theoretical references for in-depth exploration of the mechanisms underlying PELNs' cross-regulatory effects.

[Key words] exosome; plant-derived exosome-like nanoparticles; separation and characterization; cross-regulation; medical application

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230721.602

[收稿日期] 2023-05-19

[基金项目] 广东省重点领域研发计划项目(2020B020215003, 2021B0707010001); 广东省林业科技创新项目(2021KJCX015); 广东省普通高校优稀特色经济林果工程技术研究中心项目(2022GCZX002)

[通信作者] * 张宪智, 副教授, E-mail: zhangxianzhi@zhku.edu.cn

[作者简介] 潘林思, 硕士研究生, E-mail: 1564649612@qq.com



细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是由细胞分泌的各种类型囊泡的统称, EVs 具有膜结构, 且能够作为信息载体, 参与细胞间通讯^[1]。国际细胞外囊泡协会 (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) 将 EVs 主要分为 3 种: 外泌体、微泡和凋亡小体^[2]。外泌体是一种直径 30~150 nm 的膜性囊泡, 由多泡体与细胞膜融合后释放出来, 具有脂质双层膜结构, 含有脂类、蛋白质、核酸等成分^[3]。以往的外泌体研究主要聚焦于动物细胞来源外泌体, 直到近十年来, 植物外泌体才逐渐受到研究者的关注。植物外泌体一般称为植物源外泌体样纳米颗粒 (plant-derived exosome-like nanoparticles, PELNs), 大小一般为 30~300 nm^[4]。1967 年, HALPERIN W 等^[5]首次用电镜观察到胡萝卜细胞可以分泌囊泡。2009 年, REGENTE M 等^[6]在向日葵种子中分离出了外泌体样囊泡。随着 2011 年 ISEV 的成立和动物外泌体研究的蓬勃发展, PELNs 的研究也在不断深入。相比于动物外泌体, PELNs 具有原料来源广泛、容易大规模生产、提取成本低等优势, 在生物医药领域展现出广阔的应用前景。

PELNs 本身可作为一种新型药物, 也可作为一种天然的药物递送纳米载体。2013 年, JU S 等^[7]、WANG B 等^[8]从葡萄、葡萄柚中分离纯化出 PELNs, 具有治疗疾病以及作为药物递送载体的功能。随后, 研究者们从生姜、柠檬、西兰花、草莓、番茄、猕猴桃等数十种可食用水果和蔬菜中分离鉴定了 PELNs, 开展了 PELNs 的蛋白质、核酸等成分分析, 并进行了其在动物体外 (细胞) 和体内的功能研究, 证实其具有免疫调节、改善肠道菌群、消炎、抗肿瘤等多种用途, 自此 PELNs 的研究进入了多元化的发展阶段。但是, 随着 PELNs 的研究急剧增多, 越发凸显了 3 个方面问题。①PELNs 材料来源混杂, 几乎所有的 PELNs 生物医药研究均是以植物特定组织, 如根茎、果实、叶片等为材料, 直接进行组织破碎, 然后提取 PELNs。严格来说, 该方法获取的 PELNs 包含细胞内以及细胞分泌到胞外空间的 2 种成分, 不符合 EVs 的定义。②PELNs 的分离与表征技术标准有待建立, 当前的 PELNs 分离和表征技术主要参考动物外泌体的研究, 但是动物外泌体的 CD63、Tsg101、CD81 和 HSP90 等蛋白标志物在 PELNs 不存在, PELNs 的研究有待确立统一的蛋白标志物。③PELNs 的生物跨界调控作用机制研究尚处于初步阶段。PELNs 包含脂类、蛋白质、核酸、次生代谢物质等多个成分, 其发挥作用的具体物质和作用机制均有待深入地研究和探讨。本文聚焦于上述 3 个问题, 首先概述了 PELNs 的生物发生和组成成分, 并讨论了 PELNs 的分离技术、表征方法, 同时对 PELNs 在生物医学上的应用以及未来的研究方向进行了分析和展望, 以期推动 PELNs 研究规范的建立, 为深入解析 PELNs 的作用机制提供理论参考。

1 PELNs 的生物发生与组成成分

1.1 PELNs 的生物发生

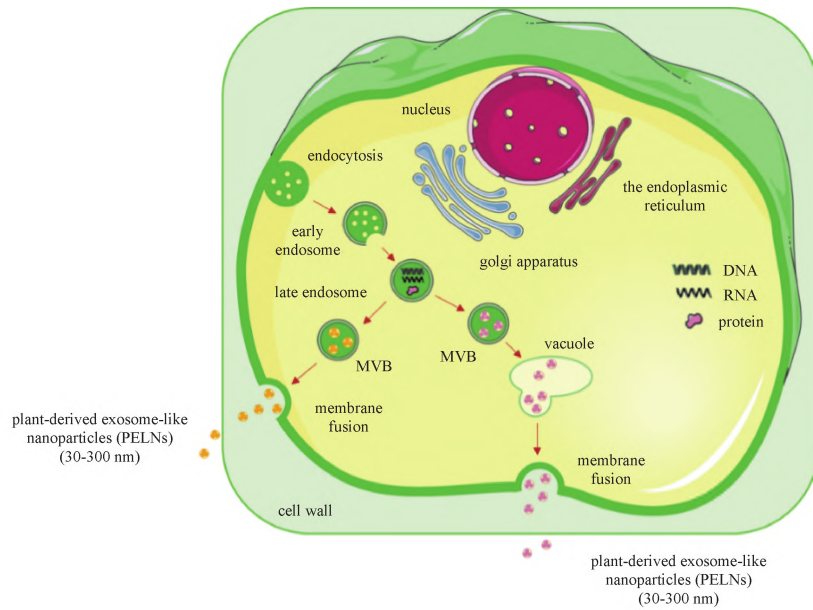
目前研究认为, 植物 EVs 的发生有 3 种途径: 多泡体

(multivesicular body, MVB) 途径、EXPO (exocyst-positive organelle) 途径、液泡 (vacuole) 途径^[1]。其中 MVB 途径为植物外泌体的主要发生途径, 通过 2 次膜内陷形成^[9-10]。细胞质膜向内凹陷后发生内吞作用, 形成早期内涵体 (early endosome, EE); 早期内涵体进一步向内凹陷形成晚期内涵体 (late endosome, LE), 包被部分细胞质和某些物质 (如高尔基体、细胞核的蛋白质和核酸), 从而产生腔内囊泡 (intraluminal vesicles, ILVs), 进而产生包含有 ILV 的 MVB; MVB 运输到细胞膜与膜融合, 并将其内容物 (ILVs) 释放到细胞外环境中, 释放的囊泡被称为外泌体^[11]。此外, MVB 还能与细胞内的溶酶体融合, 降解囊泡内容物。EXPO 途径中, 双膜结构的 EXPO 在细胞内形成后与质膜融合, 并将单层膜囊泡以 EVs 的形式释放到细胞外环境^[12]。在液泡途径中, MVB 首先将其内容物 (ILVs) 释放到液泡中, 再进一步通过液泡与质膜融合将囊泡释放到细胞外环境^[13]。

PELNs 形成过程的分子机制目前尚未明确, 可能与动物外泌体发生的机制类似, 可以分为依赖内涵体分选复合物 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 的途径和非依赖 ESCRT 的途径, 见图 1。在依赖 ESCRT 的途径中, 4 种复合蛋白 (ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II 和 ESCRT-III) 调控着外泌体的形成与运输, 其中 ESCRT-0 介导底物的识别和分选, ESCRT-I 和 ESCRT-II 主要介导内涵体膜向内出芽, ESCRT-III 负责剪切芽体的颈部, 从而使其脱落到内涵体腔内形成 MVB。在非依赖 ESCRT 的途径中, 由其他蛋白质和脂质来调节囊泡的出芽、移动和融合等过程, 如某些四跨膜蛋白^[14]。

1.2 PELNs 的组成成分

PELNs 与动物外泌体类似, 具有脂质双层膜结构, 含有脂类、蛋白质、核酸等成分。不同来源的 PELNs 中, 不仅包含与细胞形成、结构和物质转运相关的共同组分, 还含有与来源细胞的生物功能有关的特异性分子。PELNs 中的脂类主要为磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)、磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE)、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI)、二酰基甘油 (diacyl glycerol, DAG)、三酰基甘油 (triacylglycerols, TAG)、二半乳糖基二酰基甘油 (digalactosyldiacylglycerol, DGDG) 和单半乳糖基二酰基甘油 (monogalactosyldiacylglycerol, MGDG) 等^[15]。生姜的 PELNs 中除 PA 外, 还含有 DGDG 和 MGDG, 其中 DGDG 与植物叶绿体中类囊体的生成有关^[16]。已有研究表明, PA 脂质可以维持生姜 PELNs 在肠道中的积累时间和数量^[17]。PELNs 中所含蛋白质的种类较少, 主要为调节糖脂代谢的蛋白质 (包括肌动蛋白和各类酶在内的胞质蛋白)、GTPases (Rab 蛋白质家族)、与膜和囊泡相关的蛋白质 (如 ESCRT 相关蛋白 CHMP1、VAMP711) 等^[15]。前人通过蛋白质组学检测, 发现人参外泌体中含有 202 种可定量蛋白, 其中涉及核糖体通路、氧化磷酸化通路等代谢通路的蛋白较多^[18]。此外, PELNs 中还含有与植物免疫和应激相关的蛋白质^[19]。PELNs 中含有多种核酸成分,



部分图片素材使用 Servier Medical Art(<https://smart.servier.com/>)提供的图片, Servier 的 Servier Medical Art 已在 Creative Commons Attribution 3.0 Unported License(<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)获得许可(图 2 同);并参考张雪萍等^[1]、CUI Y 等^[13]和 CONG M 等^[12]文献绘制。

图 1 植物源外泌体样纳米颗粒的形成过程

Fig. 1 Formation of plant-derived exosome-like nanoparticles

如 miRNA、sRNA、DNA 和其他非编码 RNA 等^[4]。XIAO J 等^[20]运用 RNA 测序技术对 PELNs 进行分析,发现蓝莓、生姜、椰汁、橙子、猕猴桃和番茄等 11 种 PELNs 中含有大量 20~22 nt 的 miRNA。TENG Y 等^[17]从生姜 PELNs 中鉴定出了 125 种 miRNA。YIN L 等^[21]从生姜 PELNs 中鉴定出 134 种 miRNA。本实验室从姜黄 PELNs 中鉴定出 65 种 miRNA。此外, PELNs 中还有同源植物的活性小分子成分,如地黄 PELNs 中含有梓醇,柠檬 PELNs 中含有柠檬苦素和柠檬酸等,西柚 PELNs 中含有柚皮苷和柚皮素,西兰花 PELNs 中含有莱菔硫烷,生姜 PELNs 中含有辣椒素和姜烯酚。这表明 PELNs 的传递伴随着小分子化合物的转运^[4]。

目前 PELNs 的研究可重复性较差,同一种植物来源的 PELNs 在不同研究之间的一致性也较低。原因可能在于 PELNs 的发生及组分与源植物的基因型、生理状况、地理分布等密切相关。首先,不同物种或同一物种的不同品种之间,由于本身遗传差异的存在,必然导致分离得到的 PELNs 之间物质组成存在显著差异,导致其发挥不同的生物学功能。例如,不同研究者所用的生姜品种不一致,分离得到的生姜 PELNs 内容物组成不同,导致其疾病治疗效果也不同^[16,21-23]。其次,同种植物不同的器官(如根、茎、叶、花、果实、种子)产生的 PELNs 物质组成是不同的,甚至同一器官在不同发育时期的 PELNs 物质组成也存在差异^[13]。在 PELNs 的研究中,需要注意来源植物的组织及发育时期特异性。再者,由于气候环境的差

异,不同产地同一品种分离到的 PELNs 中物质组成和含量也存在差异,从而发挥不同的治疗效果^[12]。因此, PELNs 研究需要关注植物原材料的物种、品种、组织、发育时期以及产地等问题。

2 PELNs 的分离技术与表征方法

2.1 PELNs 的分离技术

PELNs 的分离方法主要包括超速离心法、聚合物沉淀法、尺寸排阻色谱法等,目前主流的方法是超速离心法。相对其他方法,超速离心法能够分离获得纯度高、完整性好的 PELNs,比较适合规模化生产。不同分离方法的特征、优缺点及目前的应用情况见表 1。

2.1.1 超速离心法 超速离心法是最常用的分离提取外泌体的技术,是外泌体提取的“金标准”^[36]。该方法通常包括差速离心法和密度梯度离心法,两者结合使用可以获得高纯度的 PELNs,见表 1。差速离心法是指先通过低速离心和较大离心力从体液或细胞培养液中去细胞碎片和破碎细胞器,再通过高速离心沉淀外泌体,整个过程在 4℃ 下进行。此方法操作简单,但需要大量样本,仪器昂贵,耗时较长,同时易存在核糖蛋白和聚集蛋白污染^[37]。目前,差速离心法已被应用于多种果蔬 PELNs 的提取,见表 1。

密度梯度离心法是指在高速离心力作用下,使不同沉降系数的各个成分各自以一定的速度沉降,在不同的密度梯度区域形成条带以区分出外泌体的方法。常用的梯度构建物质是碘克沙醇和蔗糖等^[4]。该方法分离得到的外泌体纯度

表 1 植物源外泌体样纳米颗粒的主要分离技术及优缺点

Table 1 Main separation techniques of plant-derived exosome-like nanoparticles and their advantages and disadvantages

分离技术	特征	优点	缺点	分离对象
差速离心	逐步提高离心速度,依次去除较大的颗粒,最后通过超高离心速度获得 PELNs	操作简单,能够分离大量样本	仪器昂贵,耗时较长,纯度低	生姜、柠檬、蓝莓、椰子、葡萄柚、哈密瓜、猕猴桃、橙子、梨、番茄、豌豆等 ^[24-27]
密度梯度离心	通过超速离心,在不同的密度梯度区域形成条带以区分 PELNs	纯度较高	步骤繁琐,耗时较长,需要超速离心,仪器昂贵	西兰花 ^[24] 、天门冬 ^[28] 、生姜 ^[17, 29-31] 、葡萄 ^[7] 、葡萄柚 ^[8] 、人参 ^[32] 、柠檬 ^[33]
聚合物沉淀	聚合物通过与疏水性脂质分子和蛋白结合,降低外泌体的溶解度,使 PELNs 沉淀	操作简单,时间短,成本低,可分离大量样本	纯度不高,回收率低,特异性低,且难以去除产生的聚合物	生姜 ^[21-22] 、大蒜 ^[34]
尺寸排除色谱	根据样本尺度的差异来实现分离	高效、操作简单且耗时短,纯度高	浓度低,需专业设备,成本高	西兰花 ^[35]

较高,但步骤繁琐,耗时较长,对离心时间非常敏感^[37]。DENG Z 等^[24]首先采用差速离心法从西兰花中提取了 PELNs 的粗提物,再用蔗糖密度梯度离心法分离得到纯度较高的 PELNs。采用差速离心法和蔗糖密度梯度离心法分离纯化药用植物天门冬 PELNs,优化后的外泌体平均直径约为 119 nm,具有典型的杯状纳米结构^[28]。

2.1.2 聚合物沉淀法 聚合物沉淀法一般以聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 为介质,PEG 能够与疏水性脂质分子和蛋白结合,从而降低外泌体的溶解度,使外泌体沉淀,然后通过离心收集外泌体。聚合物沉淀法操作简单,分析时间短,不需要特殊仪器设备(超高速冷冻离心机),适用于大剂量样品的处理。但是所提取的外泌体纯度不够,回收率低,且难以去除产生的聚合物,影响后续的实验分析^[38]。KALARIKKAL S P 等^[22]使用基于 PEG6000 的聚合物沉淀法分离纯化出了生姜 PELNs。

根据聚合物沉淀法已经开发了用于动物外泌体分离富集的商业化试剂盒 (ExoQuick 和 Exo-Spin),该试剂盒近期也被应用于 PELNs 的提取。在低温(4℃)条件下,沉降剂会通过减少 PELNs 的水合作用,从而改变 PELNs 的溶解度,引起 PELNs 沉淀。随后,通过纯化柱和高速离心便可回收沉淀的 PELNs。YIN L 等^[21]使用 Umibio 外泌体提取纯化试剂盒从姜汁中分离出 PELNs,避免了耗时的超速离心(150 000 r·min⁻¹)步骤。

2.1.3 尺寸排除色谱法及其他方法 尺寸排阻色谱法(size exclusion chromatography, SEC)是根据样本尺度的差异来实现分离的。将样本通过多孔聚合物微球,小尺寸物质向孔中扩散,洗脱较慢,大颗粒物质则从微球间通过而被直接洗脱^[4]。DEL POZO-ACEBO L 等^[35]使用超离心和 SEC 相结合的方法从西兰花中分离出 PELNs。目前已经开发了一些商业色谱柱(例如, Sepharose、GE Healthcare, qEV、iZon),简化了外泌体的分离步骤。这些色谱柱的孔径大约 75 nm,截留蛋白质和其他小尺寸分子,而较大的分子快速通过并在空隙体积中被洗脱。虽然 SEC 可实现外泌体与可溶性蛋白的分

离,纯度较高,但是产物浓度低,且样本类型、尺寸、色谱柱孔径、色谱柱填料以及流速等因素都会对外泌体的分离纯度和分离效率产生影响^[37]。

近几年,随着新兴分离技术的发展,出现了几种新型的外泌体分离技术。例如,微流控技术利用微管道来处理或操控微小流体,并通过免疫亲和力或物理场来实现外泌体的分离,该技术具有样品量少、准确度高、高通量等优势,但尚未标准化^[4];MORALES-KASTRESANA A 等^[39]还开发了纳米流式细胞术,对肿瘤细胞株和免疫细胞系来源的外泌体进行了分离。但是,这些新型外泌体分离技术尚未应用于 PELNs 的研究。

2.2 PELNs 的表征方法

2.2.1 超微结构检测 PELNs 的超微结构一般使用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)或原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)等进行表征^[15]。一般情况下,PELNs 与人或动物来源外泌体的结构相似,呈近球形或茶托状形貌。前人采用 AFM 对蓝莓、椰子、番茄等果蔬中的 PELNs 进行表征,发现这些 PELNs 的囊泡结构主要为圆形或椭圆形^[26];通过 TEM 对人参 PELNs 进行观察,发现有大量 100 nm 左右的囊泡为典型的茶托型或半球形双层膜结构。

2.2.2 粒径和电位检测 PELNs 的粒径一般使用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)或纳米粒径跟踪分析仪(nanoparticle tracking analysis, NTA)进行表征。DLS 是根据粒子衍射的光强波动来计算平均粒径的,对于单分散体系的测试结果比较准确。NTA 则是对单个颗粒的捕获和统计,可以反映颗粒的真实状态,提供外泌体颗粒浓度数据,更适合多相复杂体系的粒径和浓度测量^[4]。DLS 测试显示西兰花 PELNs 的粒径分布在 18.3~118.2 nm,平均粒径为 32.4 nm, Zeta 电位为 -39.2~-2.62 mV,平均为 -17.1 mV^[24]。柠檬 PELNs 粒径分布在 100~300 nm^[27],生姜的 PELNs 粒径为 (156±36) nm,电位为 (-26.6±5) mV^[21]。蓝莓、椰子、葡萄、葡萄柚、哈密瓜、猕猴桃、橙子、梨、番茄、豌豆和生姜等果蔬

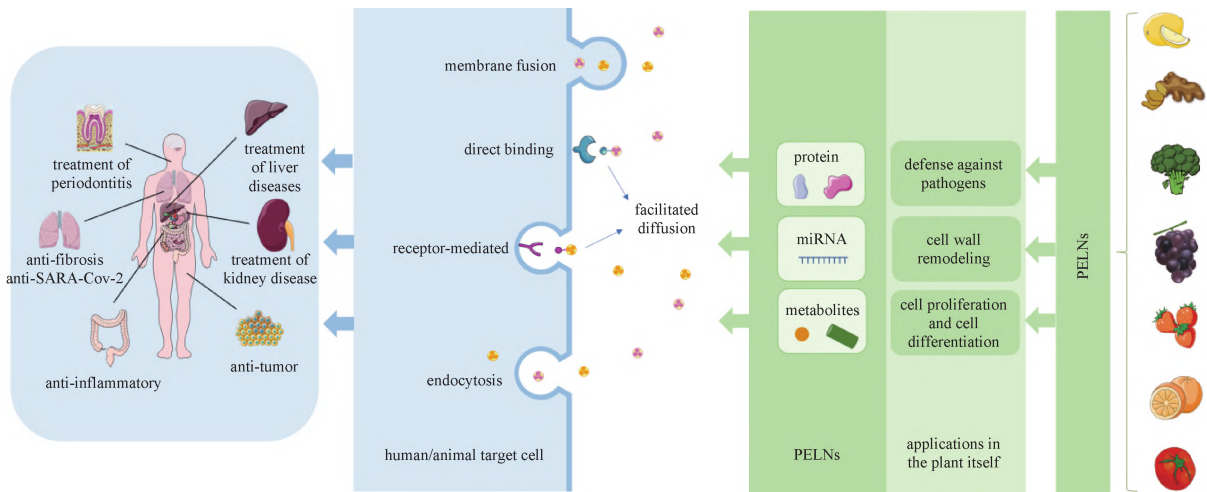
中的 PELNs 粒径分布范围类似,大多在 100~1 000 nm^[26]。辣木种子 PELNs 中有 59% 的尺寸在 240~500 nm,3.65% 的尺寸在 200~240 nm,只有 2% 的尺寸<200 nm^[40]。总体来说,PELNs 的平均粒径为 30~300 nm,电位为近中性到约-50 mV。不同来源的 PELNs 粒径和电位有所不同。此外,不同分离技术对 PELNs 的粒径和电位也有影响^[4]。

总的来说,不同的 PELNs 分离方法各有其优势,在研究中需根据研究目的、植物材料的属性等做出合理选择,并对方法进行适当调整,以满足个性化需求。目前主流的差速离心法结合密度梯度离心法需要昂贵的超高速冷冻离心机。利用聚合物沉淀法或尺寸排阻色谱法开发出适用于 PELNs 分离纯化的商业化试剂盒是一个值得探索的方向。此外,目前动物外泌体的表征标准是 TEM 形态检测+NTA 粒径测定+蛋白标志物的 Western blot 分析。但当下 PELNs 来的研究仅通过 TEM 形态检测+NTA 粒径测定来确定外泌体属性,缺乏蛋白标记分析。近期通过植物细胞外液提取分离得到的 PELNs 中发现了 TET8、PEN1 2 种蛋白标志物^[19]。但是在

PELNs 生物医学研究中,均直接破碎植物组织来分离 PELNs,并未进行 TET8、PEN1 蛋白的标记分析。后续建议开展多种 PELNs 的蛋白质组学分析,通过比较筛选保守的蛋白质成分,以鉴定 PELNs 的蛋白标志物。

3 PELNs 在生物医学中的应用

起初认为外泌体是细胞处理细胞废物的一种方式,且不会对周围细胞产生影响。近年来,随着对外泌体研究的不断深入,发现 PELNs 在植物自身物质代谢、生理功能维持和免疫防御等方面具有重要作用。同时,PELNs 能够跨界转移至哺乳动物细胞,调控细胞代谢和基因表达,参与动物体内多种生理和病理过程^[4]。PELNs 主要通过 3 种方式介导细胞通讯:①外泌体与靶细胞以旁分泌方式相互作用,通过受体-配体作用黏附到靶细胞表面,随后被内吞入靶细胞,或直接被释放到靶细胞内,从而激活靶细胞;②外泌体直接通过内吞作用进入靶细胞;③外泌体可以直接接触靶细胞进行膜融合,使外泌体中的核酸和蛋白非选择性地转移到靶细胞,从而引起靶细胞的反应^[41],见图 2。



部分图片素材使用 Servier Medical Art(<https://smart.servier.com/>)提供的图片,并参考张雪萍等^[1]、DAD H A 等^[41]和 CONG M 等^[12]文献绘制。

图 2 植物源外泌体样纳米颗粒的细胞通讯方式及其在植物和生物医学中的应用

Fig. 2 Cellular communication mode of plant-derived exosome-like nanoparticles and its applications in plant and biomedicine

3.1 PELNs 的疾病干预功能

3.1.1 PELNs 的 miRNA 跨界调控功能 2018 年 TENG Y 等^[17]研究表明,生姜 PELNs 中的 miRNAs 可以调节小鼠肠道中乳杆菌的基因表达,诱导更多白细胞介素(IL)-22 的产生,从而维持肠道稳态,改善结肠炎。2021 年 TENG Y 等^[29]进一步证实生姜 PELNs 中 aly-miR396a-5p 可以减轻肺部炎症,对 SARS-CoV-2 诱导的细胞病变具有抑制作用。该课题组还发现生姜 PELNs 被口腔病原体牙龈卟啉单胞菌 *Porphyromonas gingivalis* 选择性地吸收,其中生姜 PELNs 衍生的脂质 PA 决定了其吸收效率,且生姜 PELNs 中的脂质 PA 和

miRNAs 在预防和治疗慢性牙周炎方面具有潜在的干预作用^[30]。2022 年, YIN L 等^[21]通过高通量测序,分析了生姜和生姜 PELNs 中的 miRNA 表达谱,发现生姜 PELNs 中高表达的 miRNA 可以调控人类炎症和癌症相关途径基因的表达,含有 miRNA 的生姜 PELNs 能够被肠道细胞特异性内化,抑制 LPS 诱导的炎症反应。2020 年, POTESTA M 等^[40]的研究同样发现,辣木种子 PELNs 携带的 microRNAs 作为天然植物生物活性分子,对癌细胞具有特异性毒性作用。最近, LIU J 等^[34]研究也表明大蒜 PELNs 中的 miR-396e 调控了 PFKFB3 基因表达,在降低 LPS 诱导的分化型 THP-1 巨噬细胞的炎症



反应中起着关键作用,并且能够改善非酒精性脂肪肝的症。QIU F S 等^[42]从熟地黄 PELNs 中发现了 Rgl-exomiR-7972,其可以下调 GPR161 基因的表达,从而改善 LPS 诱导的急性肺损伤和肠道生态失调。WANG X 等^[43]从西兰花 PELNs 中鉴定了 miR167a,其可以调控参与 PI3K-Akt 通路的 IRS1 基因表达,从而抑制胰腺癌细胞的生长。

3.1.2 PELNs 的脂质和蛋白质跨界调控功能 2013 年, JUS 等^[7]发现葡萄 PELNs 可以内化到小鼠肠干细胞中,其脂质成分通过 Wnt/ β -catenin 通路诱导 Lgr5^{hi} 肠道干细胞的增殖,预防 DSS 引起的结肠炎。2017 年, DENG Z 等^[24]证实西兰花 PELNs 可以靶向树突状细胞(dendritic cell, DC),其脂质成分减少了 IFN- γ 和 TNF- α 的释放,促进抗炎因子的表达,进而改善 DSS 引起的小鼠结肠炎症状;且西兰花 PELNs 中的次生代谢成分莱菔硫烷有助于结肠炎保护。2019 年, CHEN X 等^[23]研究表明,生姜 PELNs 中的脂质成分是抑制 NLRP3 炎性小体活性的活性生物分子。2019 年, CAO M 等^[32]发现人参 PELNs 能够被巨噬细胞识别、内化,进而诱导巨噬细胞 M1 型极化,其内含蛋白质可能参与了人参 PELNs 对巨噬细胞极化的影响,能够促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,导致小鼠黑色素瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长。最近, ZHANG L 等^[33]研究证明,柠檬 PELNs 可以抑制草酸钙诱导的晶体形成和肾损伤,口服柠檬 PELNs 可以显著减轻大鼠肾结石的病情发展,静脉注射柠檬 PELNs 对结石生长也有抑制作用,其中的蛋白质可能是关键活性成分。

3.2 PELNs 的药物递送潜力

在化学小分子药物和核酸、蛋白类药物开发中,药物精准、高效递送至病灶部位,被细胞吸收从而发挥疗效是重要一环。前人已经尝试将一些难溶性小分子化合物,如阿霉素(doxorubicin, DOX)、甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)、紫杉醇和姜黄素等包裹在脂质体或高分子纳米载体中,以增强其分散性和溶解度,提高其治疗效果^[15,44]。但是人工合成的纳米载体存在生物相容性低、稳定性差、毒性大等问题,并且其穿透生物屏障和靶向递送的能力较低^[44]。外泌体因其靶向性强、低免疫原性、膜渗透性高等优势,在核酸、蛋白质及小分子药物的递送中是一种潜在的高效载体材料。水果、蔬菜、药食同源植物来源的 PELNs 作为药物递送载体具有多方面优势^[45-47]:①PELNs 的双层膜结构,增加了体内循环系统稳定性;②PELNs 为纳米级囊泡,且携带细胞表面物质,具有良好的膜渗透性、较强的穿透生物屏障能力;③PELNs 具有天然靶向能力,可以将药物送到特定部位,从而提高药物的利用率并减少对其他细胞的伤害。2014 年 WANG B 等^[8]利用葡萄柚 PELNs 装载 MTX 后,能够将 MTX 靶向递送到肠道细胞,减少 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的产生,从而缓解由 DSS 诱导的结肠炎。2016 年 ZHANG M 等^[25]采用超声的方法将 DOX 装载到生姜 PELNs 中,发现其装载效率可达 95.90% $\pm$ 0.28%,且通过叶酸配体靶向修饰后能够高效靶向 Colon-26

肿瘤细胞并抑制其生长。2018 年 LI Z 等^[31]通过叶酸配体(FA-3WJ)修饰生姜 PELNs,将 survivin 基因的 siRNA 靶向递送到 KB 癌细胞,表现出显著的敲除作用,且具有良好的生物相容性。

迄今,有关 PELNs 的研究同质化程度较高,一般按照 PELNs 的分离表征+细胞实验+动物实验的思路开展。但是,随着研究的不断积累,在 PELNs 中已经发现了数百种物质,包括小分子化合物和大分子物质(脂类、蛋白质、核酸等)。后续需深入解析 PELNs 的内含物组成,通过多组学手段分析其 miRNA、蛋白质、代谢物的种类和含量,综合还原论和系统论的方法研究 PELNs 的作用机制,为 PELNs 在疾病治疗中的合理利用奠定基础。此外,还需进一步研究 PELNs 的动物细胞摄取、转运机制,为开发核酸药物和疫苗递送载体提供科学指导。

4 总结与展望

目前,关于 PELNs 的研究尚处于初级阶段,PELNs 的应用潜力还远未被广泛认识和利用,近年来,随着人们对 PELNs 的研究日益增多,迫切要求规范 PELNs 研究的植物材料来源、形成一套标准的 PELNs 分离和表征技术,以保证 PELNs 研究的可重复性。同时需明确 PELNs 的药理成分、细胞摄取机制以及信号转导通路等,从而加深对 PELNs 调控机制的理论认识,拓展其在生物医药中的实践应用。

4.1 规范的 PELNs 植物材料来源

现今,对 PELNs 的研究主要集中在新鲜植物上,植物来源有果实、根茎、叶片、花等,忽视了不同品种的遗传差异、不同器官及器官发育时期的内在差异,导致研究的可重复性和不同研究之间的可比性较低。另外,植物栽培受季节性和区域性因素限制,而且长期的田间管理也是一个费时费力的过程,因此有必要通过工厂化生产手段来实现 PELNs 原材料的供应。现已尝试利用植物组织培养和细胞培养技术来提供持续、稳定、一致的植物原材料,从而在植物材料的源头上把控质量,提高安全性。PELNs 与其源植物具有相似的生物功能,可以根据功能需求有针对性地选择药源性植物作为 PELNs 植物材料来源,对于扩大 PELNs 的生物医学应用具有重要意义。

4.2 统一的 PELNs 分离纯化技术体系

目前,PELNs 的分离纯化技术主要参照动物外泌体的标准进行。但是超速离心法需要昂贵的仪器,成本高,不利于常规实验室开展;此外,由于缺乏 PELNs 的通用蛋白质标记物,也使得 PELNs 的判定较为困难,一致性不足。因此,亟待开发一种便携、低成本且能够大规模运用的 PELNs 分离纯化技术,以实现低成本、可重复地制备高产率、高纯度的 PELNs,保证 PELNs 作为治疗剂或药物载体的安全性、稳定性、有效性和可控性,满足临床转化的需求。聚合物沉淀结合尺寸排阻色谱法可能是一套比较适合商业化的 PELNs 分离纯化方法,后续有必要对该方法生产的不同批次 PELNs 进

行系统评价,从而确定出最优的技术参数。

4.3 清晰的 PELNs 跨界调控作用机制

PELNs 作为一种新型的药物和基因载体,具有无毒、低免疫原性、膜渗透性以及天然靶向性的优势,能够增加其在体内循环系统中的稳定性,且不会与循环蛋白相互作用,能保持其原有特性,具有极大的开发利用价值。但是,PELNs 双层膜上包括各种膜蛋白和脂类,它们具有不同的细胞亲和力,因此亟待阐明 PELNs 的细胞摄取和体内转运机制,为开发 PELNs 类药物递送载体提供依据。与此同时,近期有关生姜根茎和根茎 PELNs 的小 RNA 组学比较研究^[21]发现了 PELNs 中富集的 miRNA,证实其可以跨界调控人类的基因表达。同样,在大蒜^[34]、熟地黄^[42]、西兰花^[43]、姜黄的 PELNs 中均发现了富集的 miRNA,也可以跨界调控人类的基因表达。最新研究均表明包裹在 PELNs 中的 miRNA 可能是一类重要的活性成分,在 PELNs 的疾病治疗中发挥关键作用。未来亟须深入探究 PELNs 中的 miRNA 组成及其作用机制,为 PELNs 的临床应用提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 张雪萍,鲁雨晴,张月倩,等. 植物细胞外囊泡及其分析技术的进展[J]. 生物技术通报, 2023,39(5):32.
- [2] 张馨月,胡克. 植物外泌体的抗炎抗癌机制研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2022, doi: 10.14188/j.1671-8852.2022.0060.
- [3] ZHOU Y, TIAN T, ZHU Y, et al. Exosomes transfer among different species cells and mediating miRNAs delivery[J]. J Cell Biochem, 2017,118(12):4267.
- [4] 赵梦,李思敏,张蕾,等. 植物来源囊泡及其生物医学应用研究进展[J]. 药学报, 2021,56(8):2039.
- [5] HALPERIN W, JENSEN W A. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures[J]. J Ultrastruct Res, 1967,18(3):428.
- [6] REGENTE M, CORTI-MONZÓN G, MALDONADO A M, et al. Vesicular fractions of sunflower apoplastic fluids are associated with potential exosome marker proteins[J]. FEBS Lett, 2009,583(20):3363.
- [7] JU S, MU J, DOKLAND T, et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis[J]. Mol Ther, 2013,21(7):1345.
- [8] WANG B, ZHUANG X, DENG Z, et al. Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit[J]. Mol Ther, 2014,22(3):522.
- [9] JIANG K, DONG C, YIN Z, et al. The critical role of exosomes in tumor biology[J]. J Cell Biochem, 2019,120(5):6820.
- [10] JADLI A S, BALLASY N, EDALAT P, et al. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake[J]. Mol Cell Biochem, 2020,467(1/2):77.
- [11] CHEN J, LI P, ZHANG T, et al. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification[J]. Front Bioeng Biotech, 2022,9:811971.
- [12] CONG M, TAN S, LI S, et al. Technology insight: plant-derived vesicles: how far from the clinical biotherapeutics and therapeutic drug carriers? [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2022,182:114108.
- [13] CUI Y, GAO J, HE Y, et al. Plant extracellular vesicles[J]. Protoplasma, 2020,257(1):3.
- [14] 邢昊楠,陆梅,刘瑛琪,等. 基于外泌体的抗肿瘤药物靶向递送的研究进展[J]. 药学报, 2022,57(1):150.
- [15] 杨梦楠,刘诗琦,张静,等. 果蔬中外泌体样纳米颗粒的分离、表征和应用研究进展[J]. 食品科学, 2021,42(9):355.
- [16] ZHANG M, COLLINS J F, MERLIN D. Do ginger-derived nanoparticles represent an attractive treatment strategy for inflammatory bowel diseases? [J]. Nanomedicine, 2016,11(23):3035.
- [17] TENG Y, REN Y, SAYED M, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota[J]. Cell Host Microbe, 2018,24(5):637.
- [18] 卢姝言. 人参外泌体促进皮肤细胞增殖和伤口愈合的作用机制研究[D]. 长春:长春中医药大学, 2022.
- [19] RUTTER B D, INNES R W. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins[J]. Plant Physiol, 2017,173(1):728.
- [20] XIAO J, FENG S, WANG X, et al. Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables[J]. PeerJ, 2018,6:e5186.
- [21] YIN L, YAN L, YU Q, et al. Characterization of the microRNA profile of ginger exosome-like nanoparticles and their anti-inflammatory effects in intestinal Caco-2 cells[J]. J Agric Food Chem, 2022,70(15):4725.
- [22] KALARIKKAL S P, PRASAD D, KASIAPPAN R, et al. A cost-effective polyethylene glycol-based method for the isolation of functional edible nanoparticles from Ginger Rhizomes[J]. Sci Rep, 2020,10(1):4456.
- [23] CHEN X, ZHOU Y, YU J. Exosome-like nanoparticles from Ginger Rhizomes inhibited NLRP3 inflammasome activation[J]. Mol Pharmaceutics, 2019,16(6):2690.
- [24] DENG Z, RONG Y, TENG Y, et al. Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell AMP-activated protein kinase[J]. Mol Ther, 2017,25(7):1641.
- [25] ZHANG M, XIAO B, WANG H, et al. Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy[J]. Mol Ther, 2016,24(10):1783.
- [26] LI D F, TANG Q, YANG M F, et al. Plant-derived exosomal nanoparticles: potential therapeutic for inflammatory bowel disease[J]. Nanoscale Adv, 2023,5(14):3575.
- [27] TAKAKURA H, NAKAO T, NARITA T, et al. Citrus limon L. derived nanovesicles show an inhibitory effect on cell growth in p53-inactivated colorectal cancer cells via the macropinocytosis pathway[J]. Biomedicine, 2022,10(6):1352.
- [28] ZHANG L, HE F, GAO L, et al. Engineering exosome-like

- nanovesicles derived from *Asparagus cochinchinensis* can inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells with better safety profile[J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 1575.
- [29] TENG Y, XU F, ZHANG X, et al. Plant-derived exosomal microRNAs inhibit lung inflammation induced by exosomes SARS-CoV-2 Nsp12[J]. Mol Ther, 2021, 29(8): 2424.
- [30] SUNDARAM K, MILLER D P, KUMAR A, et al. Plant-derived exosomal nanoparticles inhibit pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*[J]. iScience, 2019, 21: 308.
- [31] LI Z, WANG H, YIN H, et al. Arrowtail RNA for ligand display on ginger exosome-like nanovesicles to systemic deliver siRNA for cancer suppression[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14644.
- [32] CAO M, YAN H, HAN X, et al. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth [J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 326.
- [33] ZHANG L, LI S, CONG M, et al. Lemon-derived extracellular vesicle-like nanoparticles block the progression of kidney stones by antagonizing endoplasmic reticulum stress in renal tubular cells [J]. Nano Lett, 2023, 23(4): 1555.
- [34] LIU J, LI W, BIAN Y, et al. Garlic-derived exosomes regulate PFKFB3 expression to relieve liver dysfunction in high-fat diet-fed mice via macrophage-hepatocyte crosstalk [J]. Phytomedicine, 2023, 112: 154679.
- [35] DEL POZO-ACEBO L, LÓPEZ DE LAS HAZAS M, TOMÉ-CARNEIRO J, et al. Therapeutic potential of broccoli-derived extracellular vesicles as nanocarriers of exogenous miRNAs [J]. Pharmacol Res, 2022, 185: 106472.
- [36] 张倩婧, 狄翠霞, 陈玉红, 等. 外泌体在肿瘤细胞及其临床应用中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(6): 945.
- [37] 周思思. 基于外泌体的肿瘤诊断与药物递送研究[D]. 南京: 东南大学, 2021.
- [38] 陈晓峰, 王开元, 梁芳铭, 等. 外泌体递药系统及其在肿瘤治疗中的应用[J]. 化学进展, 2022, 34(4): 773.
- [39] MORALES-KASTRESANA A, MUSICH T A, WELSH J A, et al. High-fidelity detection and sorting of nanoscale vesicles in viral disease and cancer [J]. J Extracell Vesicles, 2019, 8(1): 1597603.
- [40] POTESTA M, ROGLIA V, FANELLI M, et al. Effect of microvesicles from *Moringa oleifera* containing miRNA on proliferation and apoptosis in tumor cell lines [J]. Cell Death Discov, 2020, 6: 43.
- [41] DAD H A, GU T, ZHU A, et al. Plant Exosome-like nanovesicles; emerging therapeutics and drug delivery nanoplatfroms [J]. Mol Ther, 2021, 29(1): 13.
- [42] QIU F S, WANG J F, GUO M Y, et al. Rgl-exomiR-7972, a novel plant exosomal microRNA derived from fresh *Rehmanniae Radix*, ameliorated lipopolysaccharide-induced acute lung injury and gut dysbiosis [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165: 115007.
- [43] WANG X, WU B, SUN G, et al. Selenium biofortification enhanced miR167a expression in broccoli extracellular vesicles inducing apoptosis in human pancreatic cancer cells by targeting IRS1 [J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 2431.
- [44] CROMMELIN D J A, VAN HOOGEVEST P, STORM G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? [J]. J Control Release, 2020, 318: 256.
- [45] 张盈盈, 陈丽青, 刘璇, 等. 外泌体作为药物递送载体的研究进展[J]. 药学报, 2019, 54(6): 1010.
- [46] 解晓东, 练殊. 基于外泌体的纳米载体研究进展[J]. 闽江学院学报, 2022, 43(5): 56.
- [47] JIANG X, GAO J. Exosomes as novel bio-carriers for gene and drug delivery [J]. Int J Pharmaceut, 2017, 521(1): 167.

[责任编辑 丁广治]